

論文の内容の要旨

論文題目 *gad* マウスにおける軸索変性のメカニズム解析
氏名 後藤 章子

【序論】

神経軸索変性は、いくつかの慢性的な神経変性疾患や、毒物、虚血、外傷等によって引き起こされる障害によって生じることや、神経変性疾患において神経細胞死に先んじて発生し、時には神経細胞死の原因となることが近年の研究により明らかとなっている。しかし、神経軸索変性の分子メカニズムの詳細はまだ明らかとなっていない。

ubiquitin-carboxy terminal hydrolase L1 (UCH-L1) 遺伝子が欠損した gracile axonal dystrophy (*gad*) マウスは、自然発症型の逆行性神経軸索変性の動物モデルである。UCH-L1 は神経や精巣／卵巣に高発現している、脳の可溶性タンパク質の 1-5%を占めるタンパク質である。また UCH-L1 は、生体内で重要な役割を担う、エネルギー依存的なタンパク質分解系であるユビキチン-プロテアソーム系 (ubiquitin-proteasome system :UPS)の構成酵素である脱ユビキチン化酵素の一種である。脱ユビキチン化酵素は、ユビキチンとその C 末端の小さな付加物との結合を加水分解し、遊離のユビキチンを作り出す作用を有すること

が *in vitro* の研究により報告されている。加えて、UCH-L1 は神経細胞においてモノユビキチンと結合しその安定化を担うという新たな機能を有することが近年明らかとなり、UCH-L1 欠損の *gad* マウスでは、神経細胞、特に坐骨神経の神経軸索において、モノユビキチン量が低下していることが明らかとなっている。

ユビキチン量が少なくなるとUPSの標的タンパク質は十分に分解されないと推測され、モノユビキチンが顕著に低下している *gad* マウスにおいては何かしらのタンパク質が蓄積しているのではないかと、またそれらの分子が逆行性軸索変性の鍵分子となっているのではないかと推測された。そこで私は、*gad* マウスにおける神経軸索変性に関連するタンパク質を探索する目的として、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析(2D-DIGE)システムを用いて、*gad* マウスおよび正常 wild-type (WT) マウス坐骨神経タンパク質の網羅的発現解析を行うこととした。

【方法と結果】

(1) *gad* マウス坐骨神経における発現変動タンパク質の探索及び変動分子の同定

WT マウスと比較し、*gad* マウス坐骨神経において発現変動しているタンパク質を見出すために、2週齢および12週齢の異なる3個体の *gad* マウス WT 坐骨神経タンパク質サンプルに対し、2D-DIGE システムを用いたタンパク質の網羅的発現解析を行った。その結果、*gad* マウスにおいて加齢依存的に増加する7個のスポットと、2週齢12週齢いずれにおいても *gad* マウスでは検出されない1個のスポットを検出した。そこで、MALDI-TOF/TOF もしくはマウスブレインプロテオームデータベースの情報から推測した分子の特異的抗体を用いた2D-Western blotting を用いて、*gad* マウス WT マウス間で発現量に差異のあるスポットのタンパク質同定を行った。その結果、*gad* マウス神経軸索において顕著に蓄積する分子として14-3-3 および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を見出した。

(2) マウス坐骨神経におけるGAPDH及び14-3-3の免疫組織学的解析

坐骨神経は、神経軸索と、それを覆う形で存在するシュワン細胞から派生するミエリン細胞から形成されている。プロテオミクス解析は神経軸索とミエリンの混合物に対して行っていることから、坐骨神経組織における局在について調べるために、神経マーカーであるNeurofilament (NF) やミエリンマーカーであるMyelin Basic Protein (MBP) に対する抗体を用いた蛍光二重免疫染色を行い、GAPDH タンパク質の局在解析を行った。その結果、GAPDH は神経軸索において優位に発現することが明らかとなった。加えて、*gad* マウスの神経軸索内

において GAPDH の凝集体を検出した。14-3-3 は、GAPDH 同様に神経軸索において優位に発現しているが、*gad* マウスと WT マウス間での発現に差異は認められなかった。

(3) *gad* マウスにおける GAPDH 蓄積メカニズムの解析

GAPDH はリン酸化やスルホン化等の修飾を受けることが報告されており、近年特に着目されているのはスルホン化 GAPDH の機能についてである。酸化ストレスを受けると GAPDH はスルホン化されること、そしてスルホン化 GAPDH は細胞機能不全／細胞死におけるメディエーター機能を有することが報告されている。今回、GAPDH に対する特異的抗体を用いた 2D-Western blotting の結果から、*gad* マウスにおいて GAPDH が何かしらの修飾を受けて増加している可能性が示唆された。そこで私は、スルホン化 GAPDH を認識する抗体を用いた免疫組織学的解析を行い、*gad* マウスにおけるスルホン化 GAPDH の発現や局在について調査した。その結果、*gad* マウスの神経軸索内においてスルホン化 GAPDH が発現上昇していることが明らかとなった。

GAPDH 凝集体とスルホン化 GAPDH は、いずれも酸化ストレス負荷時に形成される細胞機能不全／細胞死におけるメディエーター分子とされるものである。そこで私は、*gad* マウスにおいて酸化ストレスが亢進している可能性を考え、一般的酸化ストレスマーカーである 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) 化ペプチドを認識する抗体を用いた免疫組織学的解析を行った。その結果、*gad* マウスにおいて HNE 化ペプチドが顕著に増加しており、*gad* マウスにおいて酸化ストレスが亢進している可能性が示唆された。

【考察と今後の展望】

本研究において、軸索変性モデルである *gad* マウスの神経軸索において、GAPDH の顕著な増加とその凝集体が検出されることが明らかとなった。また、2D-ウェスタンブロッティングにより、GAPDH は *gad* マウス内で何かしらの修飾を受けている可能性が示された。そして、免疫組織学的解析により、酸化ストレス負荷時に形成される細胞機能不全／細胞死のメディエーターとされている GAPDH のスルホン化修飾物が、*gad* マウス神経軸索において増加していることも明らかとなった。加えて、一般的酸化ストレスマーカーである HNE 化ペプチドが *gad* マウス神経軸索内で顕著に増加していることが明らかとなり、*gad* マウスにおいて酸化ストレスが亢進している可能性が示唆された。これらの結果から、*gad* マウスでは酸化ストレスが亢進し、細胞機能不全／細胞死メディエーターであるスルホン化 GAPDH や GAPDH 凝集体が神経軸索内に形成され、それらが *gad* マウスの軸索変性の発症原因の一端を担っている可

能性が考えられる。軸索変性の発症メカニズムの詳細は明らかとなっておらず、その有効な治療法もない現状において、本研究結果は、軸索変性の分子メカニズム解明の一端を担う有意義な結果であると考えられる。今後、GAPDH の神経軸索における機能についての詳細な解析を行い、軸索変性の分子メカニズム詳細を解明したいと考えている。